

LAMPIRAN

Lampiran 1. Foto Lokasi Pengambilan Sampel Air Panas Pacet Mojokerto



Lampiran 2. Pembuatan Media dan Reagen

2.1 Pembuatan Media *Skim Milk Agar* (SMA) dalam 1000 ml (Amelia, 2005)

- a. 20 gram susu skim dalam 250 mL akuades (dipasteurisasi pada suhu 80°C dan dipertahankan selama 30 menit)
- b. dilarutkan 5 gram pepton, 2,5 gram ekstrak ragi, 1,0 g dextrose, dan 20 gram bakto agar dalam 750 mL akuades (disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit)
- c. Susu skim yang telah di pasteurisasi dicampur dengan bahan-bahan yang telah disterilisasi dalam keadaan steril.

2.2 Media *Skim Milk Broth* (SMB) dalam 1000 ml

- a. 20 gram susu skim dalam 250 mL akuades (dipasteurisasi pada suhu 80°C dan dipertahankan selama 30 menit)
- b. dilarutkan 5 gram pepton, 2,5 gram ekstrak ragi, dan 1,0 g dextrose dalam 750 mL akuades (disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit)
- c. Susu skim yang telah di pasteurisasi dicampur dengan bahan-bahan yang telah disterilisasi dalam keadaan steril.

a. Pembuatan Larutan Standar Tirosin

Cara membuat stok tirosin 1000 ppm adalah:

$$1000 \text{ mg/liter} = \frac{100 \text{ mg}}{100 \text{ mL}} = \frac{0,1 \text{ g}}{100 \text{ mL}}$$

Untuk membuat larutan stok tirosin 1000 ppm dibutuhkan 0,1 g tirosin kemudian dilarutkan dalam 100 mL aquades. Selanjutnya dibuat larutan tirosin dengan konsentrasi 60, 120, 180, 240 dan 300 ppm dengan menggunakan rumus pengenceran sebagaimana berikut :

a. Konsentrasi 60 ppm

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 1000 = 100 \times 60$$

$$V_1 = \frac{6000}{1000}$$

$$V_1 = 6 \text{ mL}$$

b. Konsentrasi 120 ppm

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 1000 = 100 \times 120$$

$$V_1 = \frac{12000}{1000}$$

$$V_1 = 12 \text{ mL}$$

c. Konsentrasi 180 ppm

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 1000 = 100 \times 180$$

$$V_1 = \frac{18000}{1000}$$

$$V_1 = 18 \text{ mL}$$

d. Konsentrasi 240 ppm

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 1000 = 100 \times 240$$

$$V_1 = \frac{24000}{1000}$$

$$V_1 = 24 \text{ mL}$$

e.. Konsentrasi 300 ppm

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

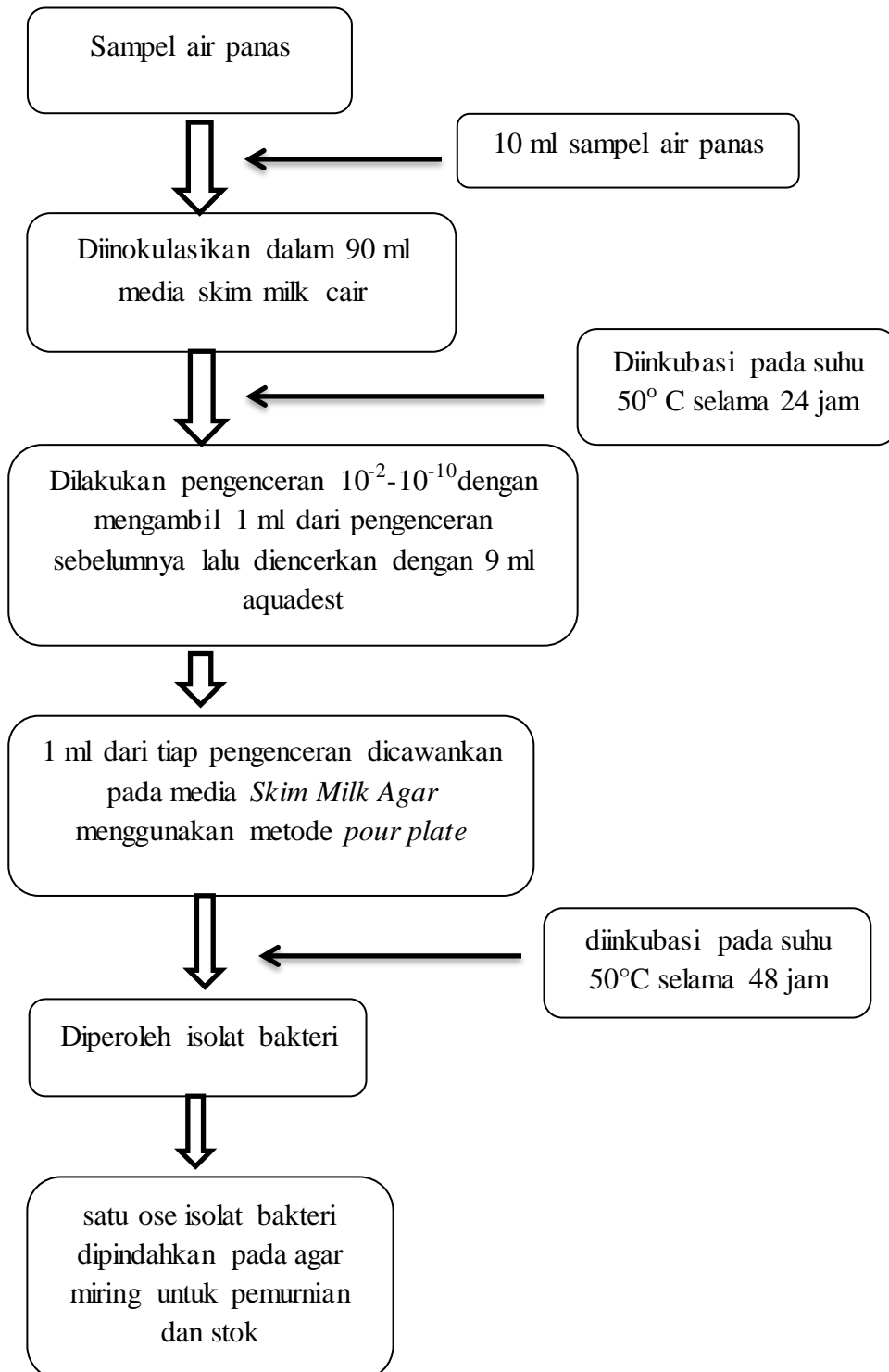
$$V_1 \times 1000 = 100 \times 300$$

$$V_1 = \frac{30000}{1000}$$

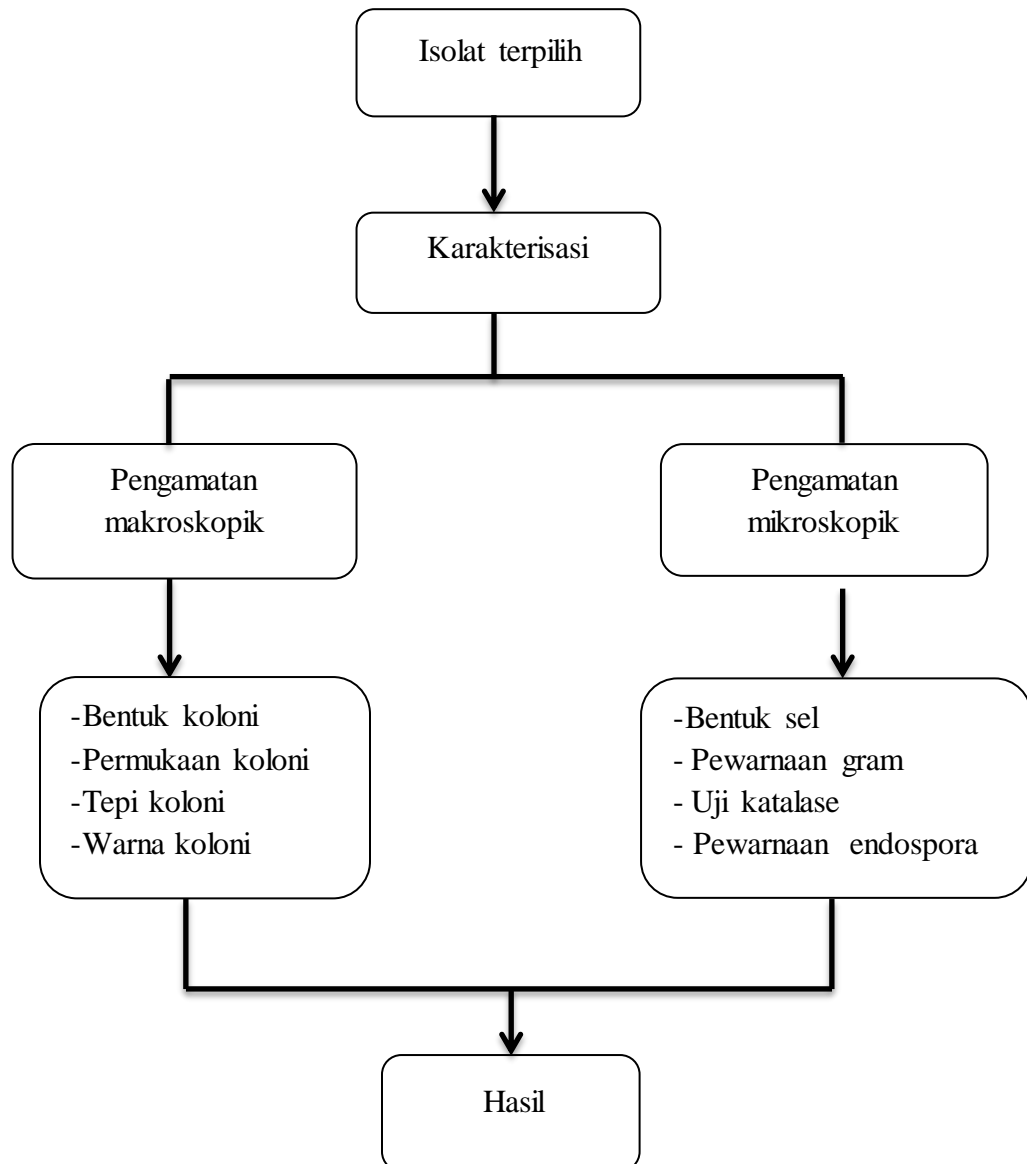
$$V_1 = 30 \text{ mL}$$

Lampiran 3. Diagram Prosedur Kerja Penelitian

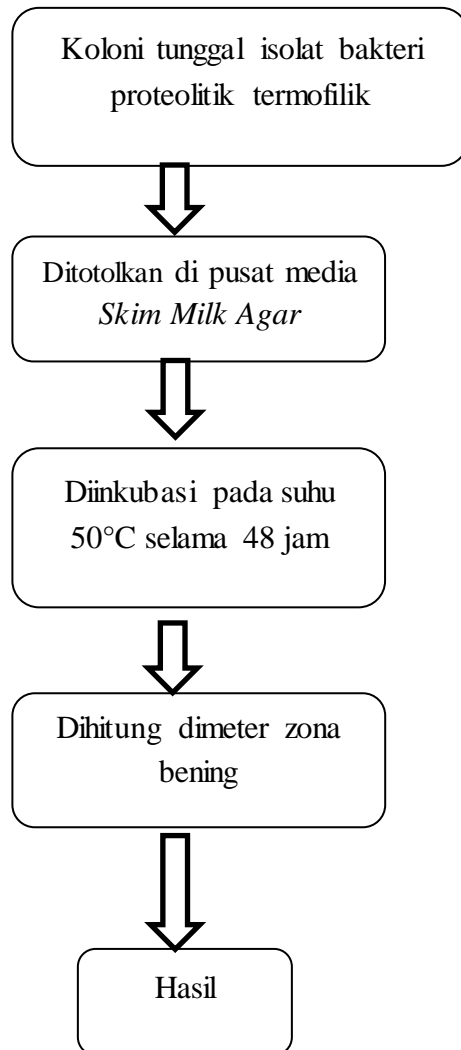
3.1 Isolasi Bakteri Proteolitik Termofilik



3.2 Karakterisasi Morfologi dan Uji Biokimia Isolat



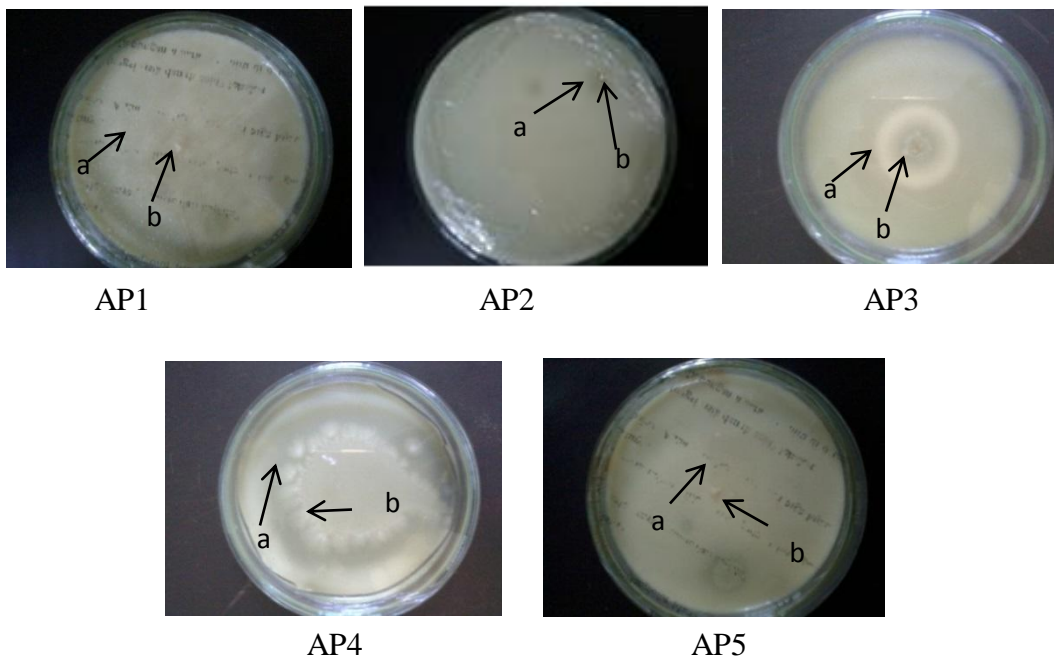
3.3 Uji Bakteri Termofilik Proteolitik Secara Kualitatif



3.4 Data Hasil Uji Kemampuan Aktivitas Proteolitik Bakteri Termofilik Secara Kualitatif

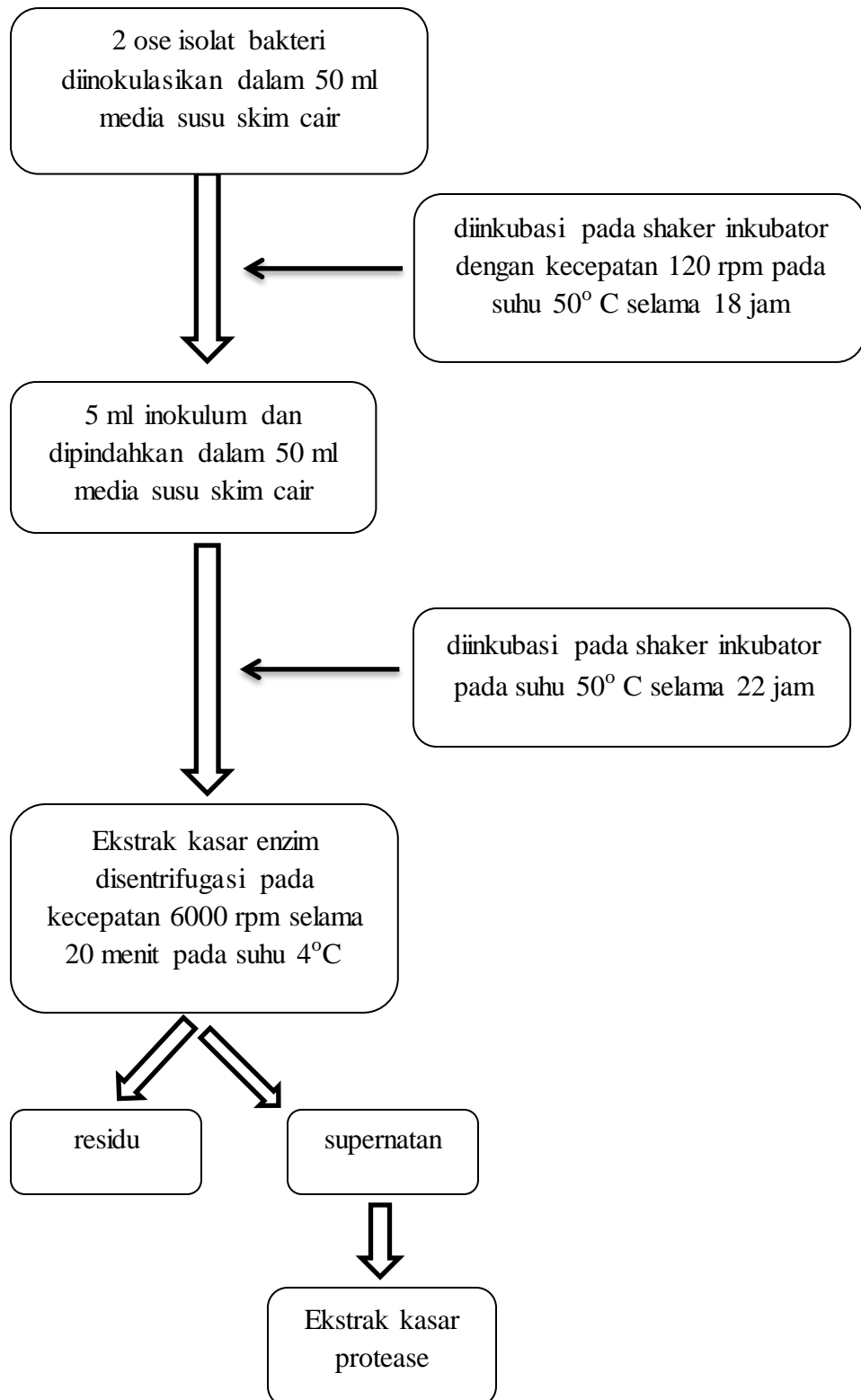
Kode Isolat	Diameter zona bening (mm)			Rata-rata diameter zona bening (mm)
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	
AP1	10	12	7	9,6
AP2	6	3	3	4
AP3	18	16	8	14
AP4	7	69	-	25
AP5	17	10	9	12

3.5 Gambar Aktivitas Proteolitik Bakteri Termofilik Secara Kualitatif

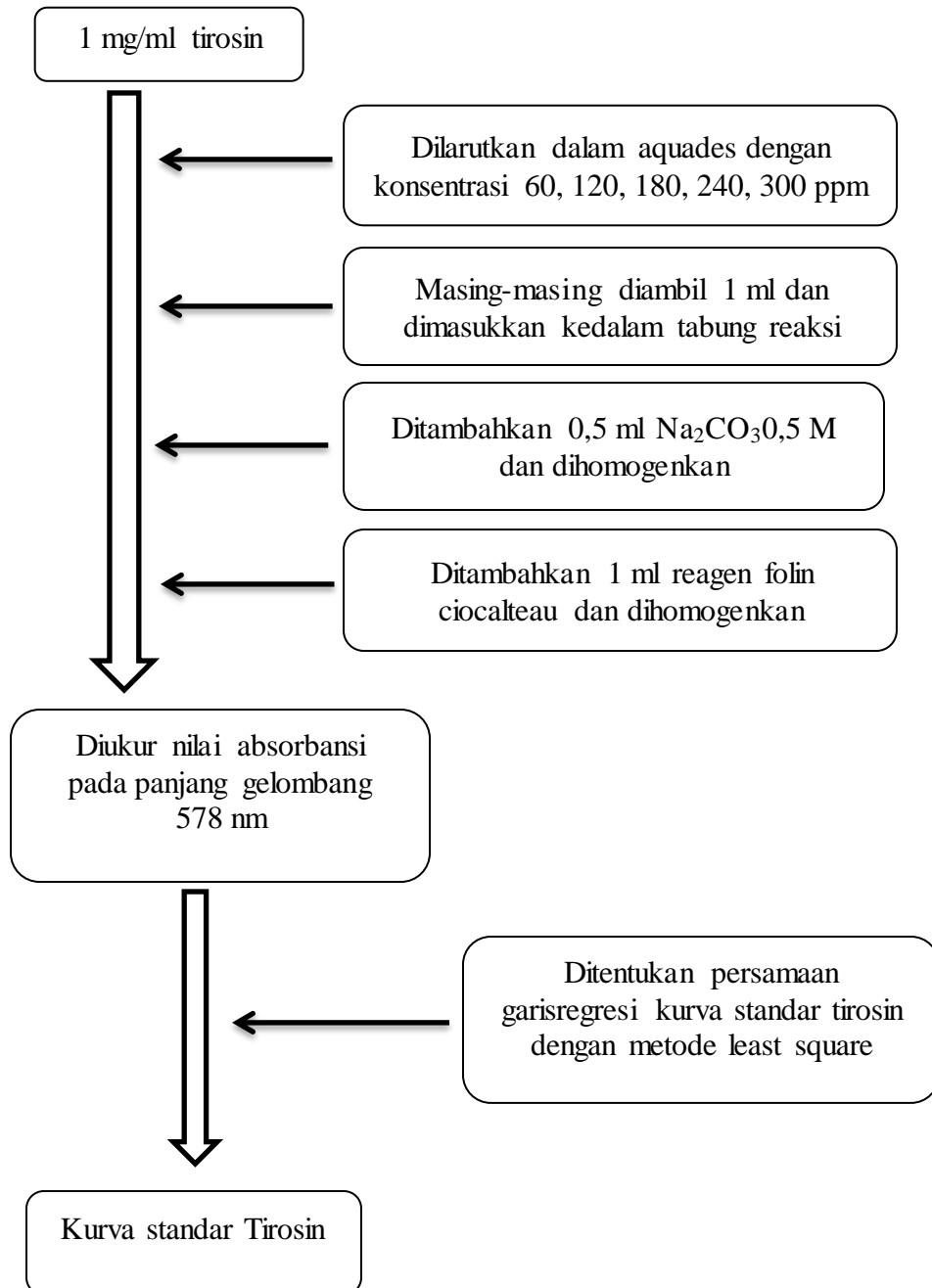


Keterangan: a. Zona bening b. Koloni

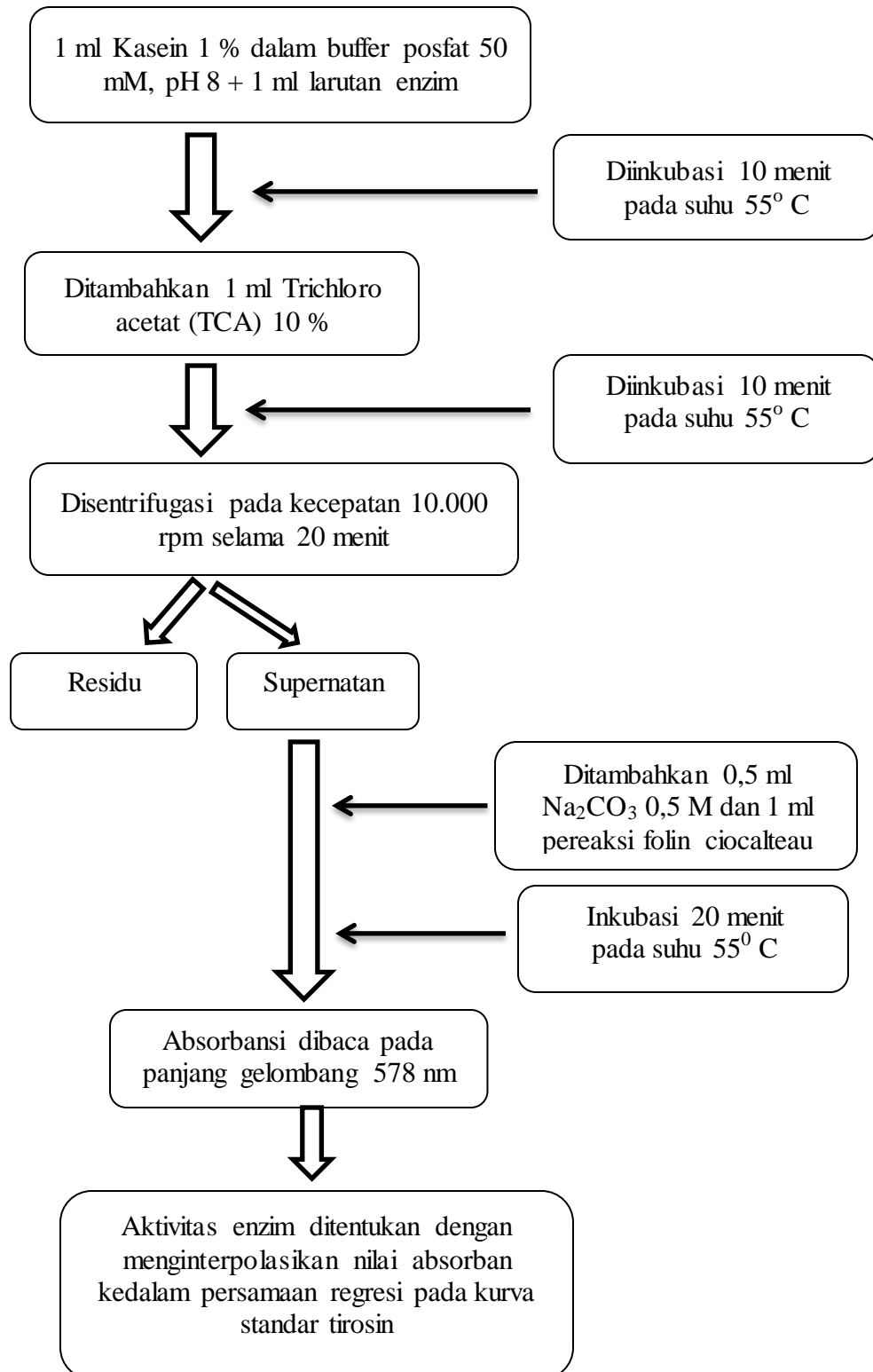
3.6 Produksi Protease



3.7 Pembuatan Kurva Standar Tirosin (Dina, 2012)



3.8 Uji Aktivitas Protease dengan Metode Ward (1984)



Lampiran 4. Perhitungan Aktivitas Enzim Protease

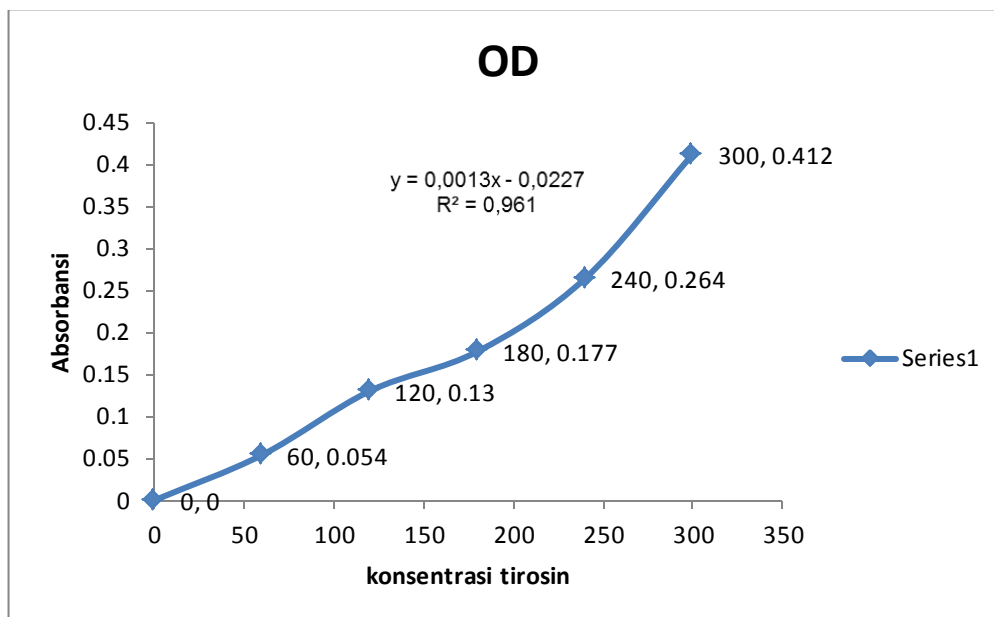
4.1 Data Nilai Absorbansi Sampel

Isolat	Absorbansi Sampel			Rata-rata
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	
Blanko	0	0	0	0
AP1	0,091	0,080	0,071	0,080
AP2	0,053	0,077	0,101	0,077
AP3	0,079	0,067	0,058	0,068
AP4	0,099	0,059	0,054	0,070
AP5	0,107	0,110	0,096	0,104

4.2 Data Nilai Absorbansi Standar Tirosin dengan Menggunakan Spektrofotometer $\lambda = 578 \text{ nm}$

No.	Konsentrasi tirosin (ppm)	Absorbansi
1	0	0
2	60	0,054
3	120	0,13
4	180	0,177
5	240	0,264
6	300	0,412

4.3 Kurva Standar Tirosin yang Diperoleh



4.4 Data Konsentrasi Tirosin Setelah Dimasukkan Persamaan Garis Regresi $y = 0,0013x - 0,0227$

Isolat	Konsentrasi tirosin (ppm)
AP1	44,076
AP2	41,769
AP3	34,846
AP4	36,384
AP5	62,538

4.5 Perhitungan Aktivitas Enzim Protease

$$\text{Rumus Aktivitas enzim (Ae)} = \frac{[\text{tirosin}]}{\text{Mr tirosin}} \times \frac{v}{p \times q} \times fp$$

Diketahui: -konsentrasi tirosin AP1= 44,076 ppm

AP2= 41,769 ppm

AP3= 34,846 ppm

AP4= 36,384 ppm

AP5= 62,538 ppm

- Mr Tirosin = 181

-v = 2 mL

-p = 1 mL

-q = 10 menit

-fp = 10

Ditanya: Aktivitas enzim (Ae) ?

$$\text{Jawab: Ae AP1} = \frac{44,076}{181} \times \frac{2}{1 \times 10} \times 10$$

$$= 0,24351 \times 0,2 \times 10$$

$$= 0,4870 \text{ U/mL}$$

$$\text{Ae AP2} = \frac{41,769}{181} \times \frac{2}{1 \times 10} \times 10$$

$$= 0,2307 \times 0,2 \times 10$$

$$= 0,4615 \text{ U/mL}$$

$$\text{Ae AP3} = \frac{34,846}{181} \times \frac{2}{1 \times 10} \times 10$$

$$= 0,19252 \times 0,2 \times 10$$

$$= 0,3850 \text{ U/mL}$$

$$\text{Ae AP4} = \frac{36,384}{181} \times \frac{2}{1 \times 10} \times 10$$

$$= 0,20102 \times 0,2 \times 10$$

$$= 0,4020 \text{ U/mL}$$

$$\text{Ae AP5} = \frac{62,538}{181} \times \frac{2}{1 \times 10} \times 10$$

$$= 0,34551 \times 0,2 \times 10$$

$$= 0,6910 \text{ U/mL}$$

Lampiran 5. Dokumentasi Penelitian

5.1 Alat-alat penelitian



Hot plate



Rotary Shaker



Lemari pendingin
(tempat menyimpan bakteri)



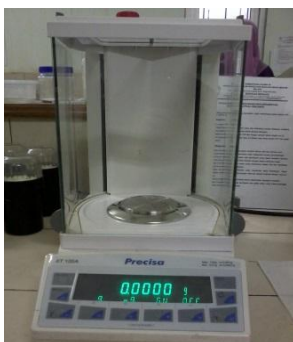
Autoklaf



Inkubator



Panci untuk dextruksi



Timbangan analitik



LAF (Laminar Air Flow)



Peralatan gelas
laboratorium







Spektrofotometer





Sentrifugasi


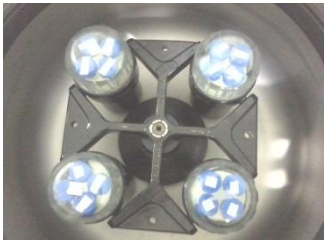
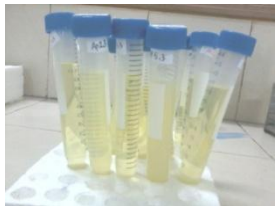
5.2 Bahan-bahan Penelitian

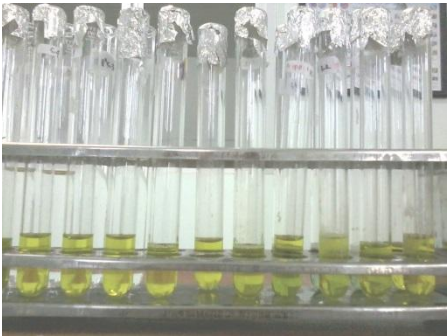

	
<p>Spiritus, alkohol 70%. dan aquades</p>	<p>Aluminium foil, plastik wrap, kapas, plastik tahan panas, tisu, dan karet</p>
	
<p>Media <i>Skim Milk Broth</i></p>	<p>Media <i>Skim Milk Agar</i></p>

5.3 Dokumentasi Penelitian

a. Isolasi Bakteri Termofilik Proteolitik	
	
Hasil isolasi bakteri proteolitik termofilik dari sumber air panas Pacet Mojokerto	Biakan murni isolat bakteri proteolitik termofilik

b. Uji Bakteri Termofilik Proteolitik Secara Kualitatif	
	
Koloni tunggal isolat bakteri proteolitik termofilik	Dihitung diameter zona bening

c.Produksi Enzim Protease		
		
Inokulum bakteri proteolitik termofilik dalam media susu skim cair	disentrifugasi pada kecepatan 6000 rpm selama 20 menit pada suhu ruang	Ekstrak kasar enzim protease

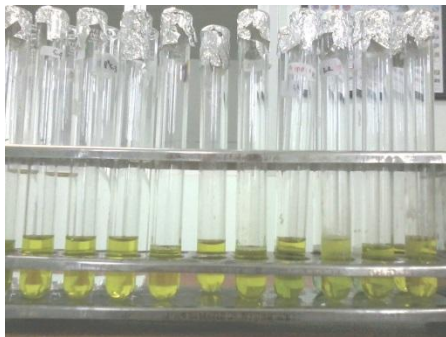
d.Pembuatan Kurva Standar Tirosin	
	
Tirosin ditambahkan Na_2CO_3 dan reagen folin ciocalteau	Diukur absorbansi pada panjang gelombang 578 nm

e.Uji Aktivitas Enzim Protease



Kasein dalam buffer fosfat+enzim
ditambahkan TCA

Disentrifugasi pada kecepatan 10.000
rpm selama 20 menit



Tirosin ditambahkan Na_2CO_3 dan
reagen folin ciocalteau

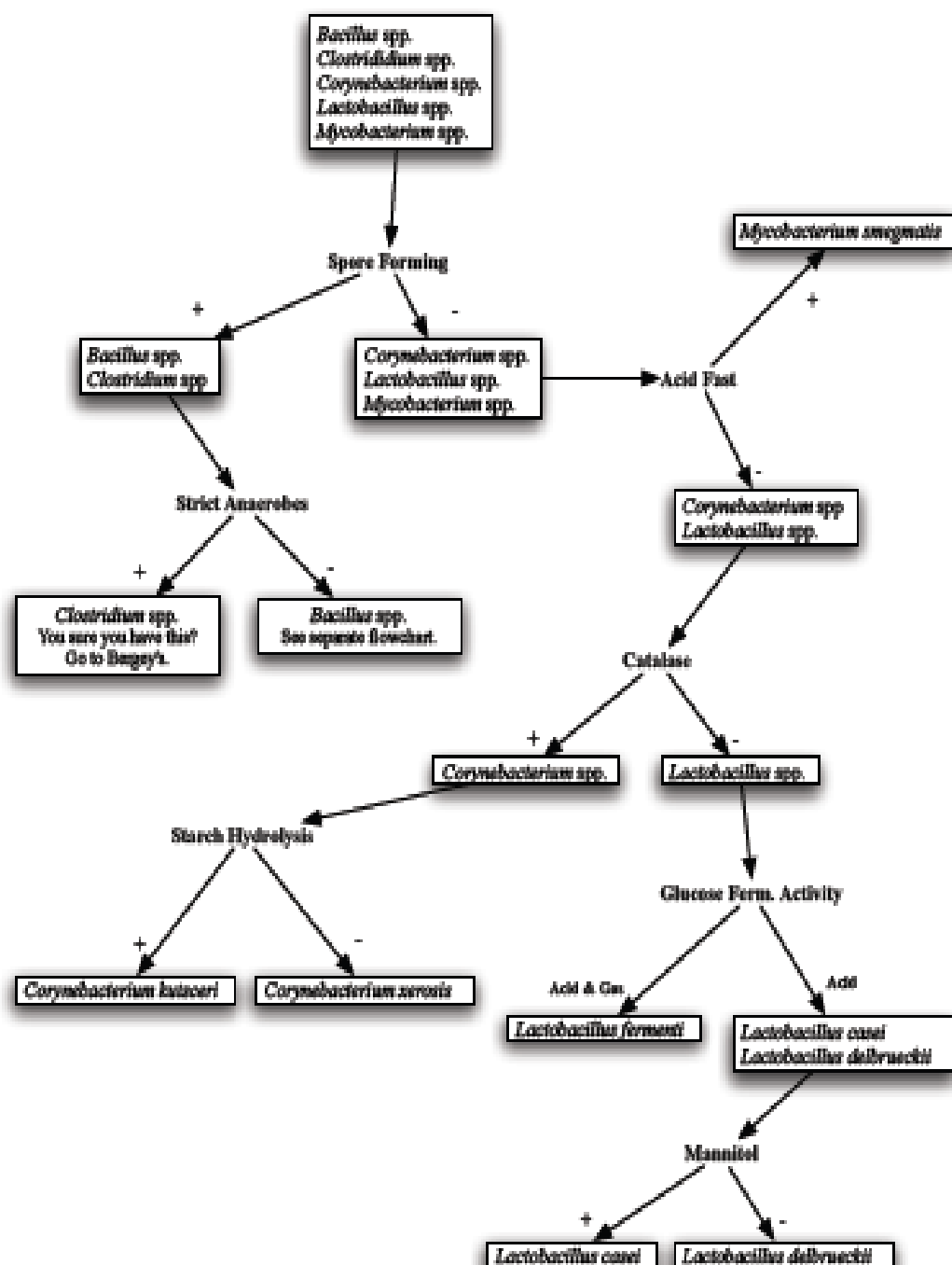
Diukur absorbansi pada panjang
gelombang 578 nm

Lampiran 6. Diagram Alir Identifikasi Bakteri Gram Positif

Identification flow charts

Gram Positive Rods ID Flowchart

Gram Positive Rods



Identification flow charts

Bacillus spp. ID Flowchart

Bacillus spp.

